

Tissue-type Plasminogen Activator in Chronic Subdural Hematoma

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8095

慢性硬膜下血腫における Tissue-type Plasminogen Activator

—その免疫組織学的局在と意義—

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

藤 澤 博 亮

(平成1年2月1日受付)

Tissue-type plasminogen activator (t-PA) に対するモノクローナル抗体を用いて慢性硬膜下血腫被膜における t-PA の免疫組織学的同定を行い、また enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) により血腫内容中における t-PA 値を測定し、慢性硬膜下血腫の血腫増大の機序における t-PA の役割について検討した。対象は慢性硬膜下血腫119症例141例 (両側例20例, 再発例5例), 硬膜下水腫10例である。被膜の免疫組織学的検索では、血腫外側被膜 (外膜) の血管洞および毛細血管の内皮細胞に強度の t-PA の免疫反応が認められ、細動脈には反応は見られなかった。硬膜の動静脈壁にも t-PA の反応が見られたが、外膜血管に比べると反応は弱かった。血管内皮細胞以外の細胞には t-PA の反応は認められなかった。血腫内側被膜 (内膜) には t-PA の反応は認められなかった。血腫141例の t-PA 値は 1.2ng/ml から 41.2ng/ml で対数正規分布型を示し、その平均値±標準偏差は 10.1 ± 6.9 ng/ml (mean±S. D.) で、慢性硬膜下血腫患者末梢血83例の t-PA 値 3.7 ± 1.4 ng/ml, 硬膜下水腫10例の t-PA 値 3.1 ± 1.6 ng/ml に比べ有意に高値を示した。外膜の血管洞の発達しているものほど血腫内 t-PA 値は高かった。患者末梢血のフィブリン・フィブリノーゲン分解産物 (fibrin and fibrinogen degradation products, FDP) 値、プラスミノゲン値は正常であったが、血腫内の FDP 値は非常に高値で、プラスミノゲン値は低値であった。しかし、両者とも血腫内の t-PA 値との間に有意の相関は見られなかった。血腫内ヘモグロビン値、血腫内の白血球数と t-PA 値との間には相関は見られず、血腫腔への出血量と t-PA 値との間にも相関は見られなかった。血腫内 t-PA 値は外傷から30日から50日の間でピークが見られた。血腫内に凝血の多いものでは血腫内 t-PA 値はより低値を示した。頭部 CT 所見では、層形成型が他の型より血腫内 t-PA 値は高い値をとる傾向を示した。臨床症状では、昏睡の群が他の群よりも血腫内 t-PA 値は高い値をとる傾向を示した。慢性硬膜下血腫では、血腫外膜の血管洞と毛細血管の内皮細胞に豊富に存在する t-PA の過剰放出が局所的線溶性亢進の本態である。一方、線溶性亢進により、止血、凝固の障害が起り、外膜毛細血管の血腫腔への開口部から出血が繰り返される。その結果、血腫の増大が起ると考えられた。

Key words chronic subdural hematoma, tissue-type plasminogen activator, hyperfibrinolysis, immunohistochemistry, enzyme linked immunosorbent assay

慢性硬膜下血腫は頭痛、嘔吐、意識障害などの頭蓋内圧亢進症状や片麻痺、あるいは特に高齢者では痴呆などの精神症状をもって発症する。軽微な外傷がその

引き金になるとされるが、明らかな外傷の既往を欠く症例も多い。慢性硬膜下血腫では血腫内容が進行性に増大し数週間～数カ月の無症状の期間が存在する。血

Abbreviations: ABC, Avidine-Biotin-Peroxidase Complex; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; FDP, fibrin and fibrinogen degradation products; PA, plasminogen activator; PAI, plasminogen activator inhibitor; t-PA, tissue-type plasminogen activator;

腫は硬膜側の外側被膜(外膜)とクモ膜側の内側被膜(内膜)に囲まれ、また、凝血を含むこともあるが、一般に流動性を保ち暗赤色ないし赤褐色を呈する。このように血腫内容の進行性増大、血腫の流動性および血腫被膜の存在などが本疾患の特徴である。

1857年 Virchow¹⁾による硬膜の炎症説以来、慢性硬膜下血腫における被膜形成と進行性の血腫増大の機序についてこれまで多くの学説が提唱されてきた。被膜の成因について、Trotter²⁾は頭部外傷による架橋静脈の破綻により硬膜下腔に出血が起こり、硬膜とクモ膜からそれぞれ外膜と内膜が形成されるとした。現在では、中村³⁾のように硬膜下の凝血から反応性に肉芽性の被膜が形成されるとする立場をとるものが多い⁴⁾。

血腫増大の機序に関しては、1)浸透圧、2)滲出・漏出および3)出血の3つが重要だと考えられている。浸透圧説は、1932年 Gardner⁵⁾により提唱された。彼は血腫被膜は半透膜の性質をもち、血腫は髄液と蛋白含有量の差による浸透圧によって増大するとしたが、この説は現在では否定的に考えられている。下地⁶⁾は血腫の膠質浸透圧は高いが、これは出血に続く赤血球の溶血によるヘモグロビンの遊離およびヘモグロビン分解産物によるものであるとし、Ito⁷⁾は血腫内容中の高い膠質浸透圧による血腫増大因子としての作用は全血腫容量の5%にすぎないとした。

滲出と漏出については、RI脳スキャンで血腫腔が陽性像を呈すること⁸⁾や、血腫内容の蛋白量が血清よりも高値を示すこと¹⁰⁾などから血腫増大の一因をなすと考えられている。

Putnam & Cushing¹¹⁾は、繰り返す出血が血腫を増大させると主張した。山本¹²⁾およびIto¹³⁾は血腫内に新鮮出血を思わせる変形の少ないドーナツ型の赤血球を認め、また⁵¹Cr標識赤血球を用いて血腫被膜からの血腫内への出血を証明した。水腰¹⁰⁾、山嶋¹⁴⁾は血腫外膜の線維層毛細血管の血腫腔への窓状開口を形態学的に証明した。出血の原因として、近年では局所的線溶活性亢進の立場から論じられている。伊藤¹⁵⁾は血腫内容はフィブリノーゲンを欠き、フィブリン・フィブリノーゲン分解産物(fibrin and fibrinogen degradation products, FDP)が高値であることを認め、フィブリン膜に血腫外膜を重畳するとフィブリン溶解窩を生じ、また抽出法による定量で血腫外膜に多くの組織プラスミノゲンアクチベーター(tissue-type plasminogen activator, t-PA)が存在すること

から局所的線溶活性の亢進の重要性を指摘した。Labadie¹⁷⁾は慢性硬膜下血腫症例において血腫中のFDP増加とプラスミノゲン活性の低下を指摘し、血腫内での線溶亢進を指摘した。前田¹⁸⁾は血腫内容のユーグロブリン分画線溶時間測定により線溶亢進を指摘し、出血持続の原因とした。木村¹⁹⁾は血腫内容のトロンボエラストグラフによる検索で二次線溶の亢進を指摘し、血腫内容の凝固抑制と二次線溶の亢進が血腫増大の原因とした。また斎藤²⁰⁾は血腫内容中ではプラスミンと α_2 プラスミン・インヒビターが高値であることを証明した。

本研究では、t-PAの血腫被膜における免疫組織学的同定と血腫内容中のt-PA値の測定により、慢性硬膜下血腫の血腫増大の機序に対するt-PAの役割について検討した。

対象および方法

金沢大学脳神経外科および関連病院における慢性硬膜下血腫119症例、141例について、手術時に採取した血腫被膜、血腫内容および患者静脈血(麻酔中または安静時)を研究材料とした。手術はいずれも頭頂部近くの径4cmの小開頭または穿頭術によった。症例のうち男性は90例、女性は29例で、年齢は12歳から87歳(平均64.8歳)であった。片側例は106例、両側例は20例で、再発症例は5例であった。また硬膜下水腫の10例についても同様に検索の対象とした。

I. 被膜標本の処理・免疫組織化学的検索・光顕的観察

外膜は硬膜に付着した状態で、内膜は血腫洗浄後、それぞれ小片を採取した。標本の一部はOCT compound(マイルス・三共株式会社、東京)に液体窒素で凍結包埋後、クライオスタット(Miles Laboratories Inc, Naperville, USA)にて6 μ の切片を作製した。切片を冷風乾燥した後、95%エタノールにて10分間固定した。他の標本は10%中性ホルマリン緩衝液にて固定後パラフィンに包埋し薄切切片を作製した。この際、固定時間は30分から144時間とし、また蛋白分解酵素としてプロテアーゼ(protease type XXIV)(Sigma社、St. Louis, USA)による前処理を行いそれぞれ最適な固定時間、プロテアーゼの濃度および処理時間を決定した。凍結切片およびパラフィン切片を0.3% H₂O₂加メタノールに10分間浸し内因性ペルオキシダーゼ除去後、Avidine-Biotin-Peroxida-

u-PA, urokinase-type plasminogen activator; v-PA, vascular plasminogen activator; 外膜, 外側被膜; 内膜, 内側被膜

se (ABC) 法により染色した。一次抗体としてマウス抗ヒト t-PA モノクローナル抗体 (Bioscott 社, Scotland, UK) を用いた。本抗体は 7 種のサブグループ (ESP1~ESP7) から成り、このうち ESP4, ESP5, ESP6 の 3 種の抗体を用いた。この 3 者は、t-PA 分子への結合部位をそれぞれ異なる²⁰⁾。一次抗体を 4°C で 16~24 時間反応させ、続いてビオチン化二次抗体、ABC complex (Vecstain 社, Burlingame, USA) をそれぞれ室温で 1 時間および 30 分間反応させた。また一次抗体の代わりに正常マウス IgG, PBS を用いたものを対照群とした。

パラフィン切片の一部はヘマトキシリン・エオジン染色ならびにエラストイカ・ワン・ギーソン染色を施し光顕で観察した。

II. 血腫内容・末梢血の t-PA 測定

血腫内容および静脈血は直ちにクエン酸ナトリウム加採血管に採取し、可及的速やかに 3,000 回転 10 分間冷却遠心した後、上清を小スピッツに分注し -70°C で保存した。t-PA 濃度は、t-PA enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) キット (American Diagnostica inc, New York, USA) を用い、サンドイッチ ELISA にて測定した^{22,23)}。

III. 血腫内容の線維系因子、ヘモグロビンおよび白血球成分の測定

血腫内容のプラスミノゲン、FDP、ヘモグロビン、白血球を測定し血腫中 t-PA 値との関連を検討した。プラスミノゲンの測定は合成基質法、FDP の測定はラテックス凝集反応によった。

IV. 血腫内への出血量の測定

24 例について Ito ら²⁴⁾ の自家 ⁵¹Cr 標識赤血球による還元法により血腫腔への出血量を測定した。これによると 1 日あたりの血腫腔への出血量 (W) は、血腫容積 (V) に対する容積率で表され、血腫中および血液中の放射能係数をそれぞれ H, B とし、⁵¹Cr 標識赤血球輸血から検体採取までの時間を T とすると次式で算出される。

$$W/V = H/B \times 24/T \times 100 (\%)$$

血腫腔への出血量と血腫中 t-PA 値との関係を検討した。

V. 統計的検討

測定値はすべて平均値 ± 標準偏差として表した。各群間の平均値の差の検定には、2 群間では Student または Welch の t 検定を用い、3 群以上では 1 元配置分散分析後、Scheffé の多重比較を行なった。2 変量間の相関の検定には Spearman の順位相関係数を求めた。いずれも、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 被膜標本の光顕的観察・免疫組織化学的検索

1. 光顕的観察

血腫外膜の厚さは 0.10mm から 1.10mm にわたっていた。中等度以上の厚さをもつ典型的な血腫外膜の血管分布は、硬膜側に密、血腫腔側に疎でそれぞれ血管洞層、線維層と呼ばれる 2 層に区別された。被膜の比較的薄いものでは線維層の形成が明確でなく、被膜のほぼ全層にわたり血管洞の分布がみられるものがあった。外膜の器質化の程度は、被膜が薄く膠原線維の増生も少ない幼若なものから、被膜が厚く被膜全体に著明な膠原線維の増生のみられるものまで幾つかの異なった型がみられた。膠原線維の増生が少ない場合、これは硬膜側にみられ、次第に血腫腔側に増生が進む所見を示した。膠原線維が外膜全体に密に増生する例では血管洞層と線維層の両者は区別し難くなった。膠原線維の増生が密になると血管洞および毛細管はその数を減じ、血管洞の分布は膠原線維の増生の程度に反比例する傾向がみられた。外膜内には好酸球・好中球・形質細胞・リンパ球など各種の炎症細胞の浸潤がみられるが、症例毎にその種類や浸潤の程度には違いがみられた。

クモ膜側の被膜 (内膜) は外膜より薄く、膠原線維の疎な網目状構造から成っていた。標本の採取部位は血腫腔のほぼ中心部であり、検索した症例のうち初回手術例では内膜内に血管は認められなかった。外膜内および血腫内容中に好酸球が多量に見られた例では内膜内にも好酸球の浸潤がみられた。

硬膜下水腫では、急性硬膜外血腫の手術後に硬膜下に液体の貯留をみた 1 例について組織学的に検索した。硬膜下に血管を欠く極めて薄い (0.04mm) 新生膜が認められた。

2. 免疫組織化学的検索

パラフィン切片では固定時間と染色前の処理に工夫を要した。固定時間が 60 時間を越えたものでは t-PA の抗原性が極端に低下した。また蛋白分解酵素としてはプロテアーゼを用いたが、良好な染色標本を得るには固定時間は 2~3 時間程度で、プロテアーゼ処理は 0.025% で 5~10 分行なうのが最適であった。凍結切片による検索では抗原性がよく保たれたが、パラフィン切片ではプロテアーゼ処理を施しても染色性に幾分かばらつきがみられた。しかし、形態の保存という点ではパラフィン切片が数段優るため、同一症例で凍結およびパラフィン切片の両者を作製して検討した。

一次抗体として抗体 ESP5, ESP6 を用いた結果で

は、検索した症例すべてにおいて、t-PA は外膜の血管洞と毛細管の内皮細胞、および硬膜の動・静脈の内皮細胞に分布していた。外膜における血管は強陽性、硬膜の静脈は中等度陽性、硬膜の動脈は弱陽性に染色された(図1, 2, 3, 4)。外膜の血管は血管洞および毛細管でほとんどが占められるが、稀に観察される細動脈では血管洞や毛細管と異なり t-PA の免疫反応は認められなかった(図3)。血管洞層と線維層の2層が明瞭に区別される場合でも血管洞層および線維層内の毛細血管の内皮細胞の染色性に差は認められなかった。また症例毎の外膜の厚さ、血管分布あるいは各種炎症細胞の浸潤度の違いにより、t-PA の染色性に差は認められなかった。線維芽細胞、各種炎症細胞など血管内皮細胞以外の細胞には t-PA の反応はみられなかった。血管の欠如する内膜では t-PA の免疫反応は認められなかった。

一次抗体として抗体 ESP4 を用いた場合には一般に染色性が悪く、t-PA の反応が見られた場合には、血管洞と毛細血管の内皮細胞の一部のみに認められた。しかし外膜、硬膜ともにその反応は抗体 ESP5, ESP6 を用いた場合に比べて微弱であった。以上の慢性硬膜下血腫の被膜における t-PA の染色性をまとめると表1のようになる。

II. 血腫中、水腫中および末梢血中の t-PA 値

141側の血腫中の t-PA 値は 1.2ng/ml から 41.2 ng/ml で、t-PA 値の分布は対数正規分布型を示した(図5)。141側のうち98側(70%)は7 ng/ml 以上であった。また血腫内容中 t-PA 値は 10.1 ± 6.9 ng/ml ($n=140$)、末梢血中 t-PA 値は 3.7 ± 1.4 ng/ml



Fig. 1. Photomicrograph of frozen section stained by the Avidine-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) method with monoclonal antibody (ESP6) against tissue-type plasminogen activator (t-PA). The lower part of the specimen is the outer membrane of chronic subdural hematoma and the upper part is dura mater. The intense immunostaining is seen in the sinusoidal and capillary endothelial cells in the outer membrane. No other cells than the endothelial cells are stained. Counterstained with hematoxylin. $\times 40$.

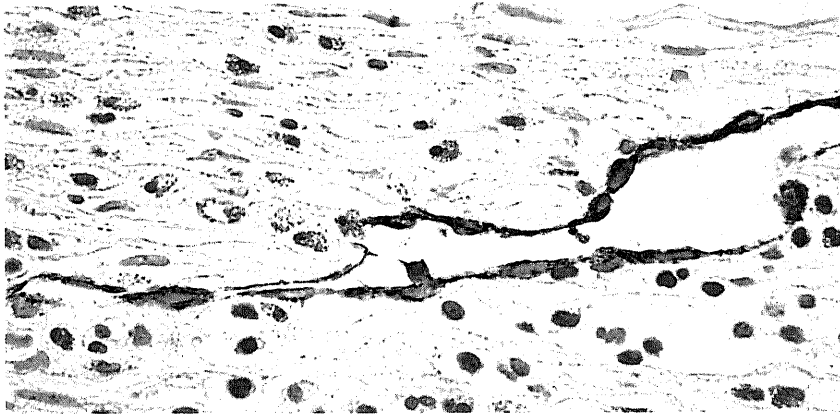


Fig. 2. Photomicrograph of paraffin section stained by the ABC method with monoclonal antibody (ESP6) against t-PA. Immunoreactivity of t-PA is localized in the cytoplasm of endothelial cells lining of sinusoid in the outer membrane. There are many eosinophils in the outer membrane, but t-PA reactivity is not found in them. Counterstained with hematoxylin. $\times 200$.

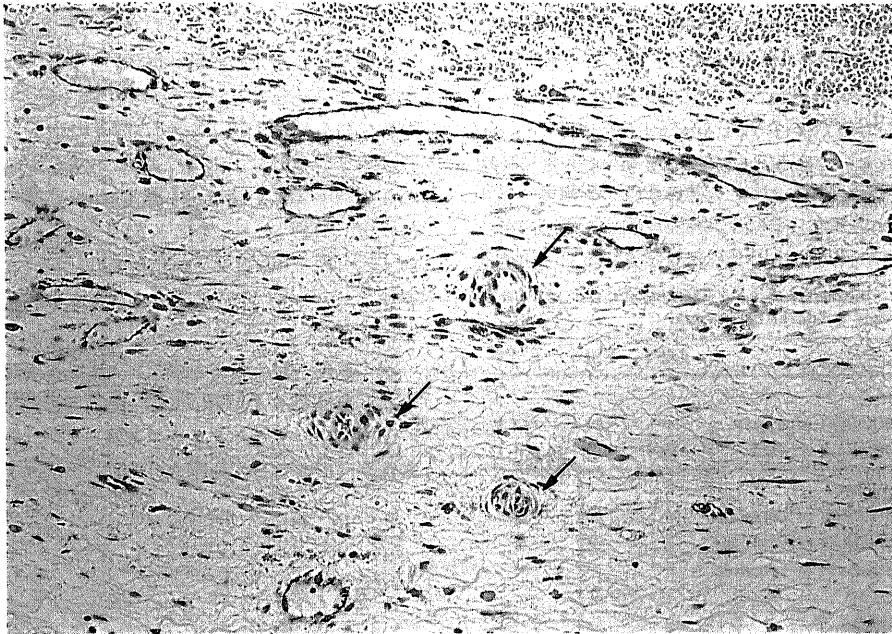


Fig. 3. Photomicrograph of the outer membrane stained by the ABC method with monoclonal antibody (ESP6) against t-PA. Intense staining is found in endothelial cells of sinusoids and capillaries, but no positive reaction is observed in endothelial cells of three arterioles (arrows). Couterstained with hematoxylin. $\times 50$.

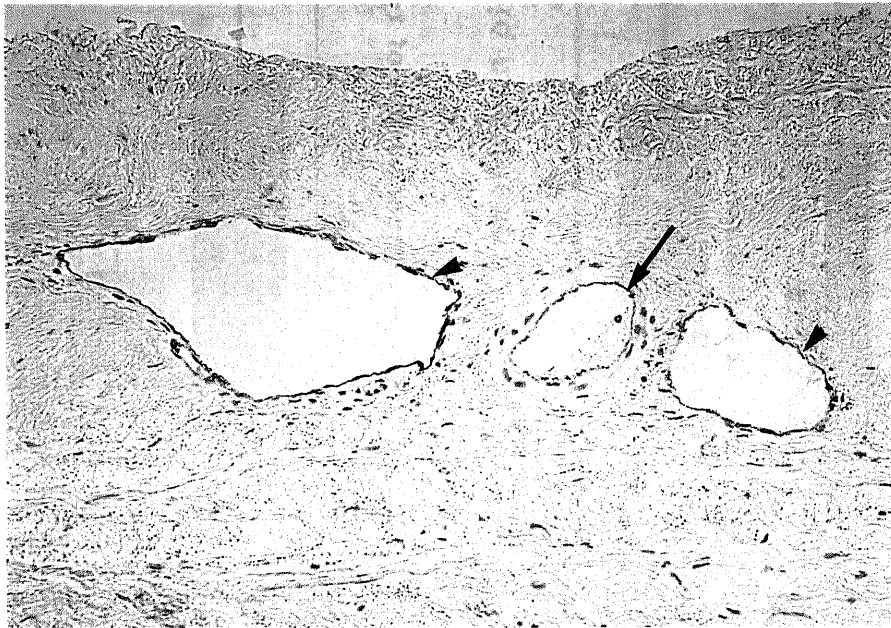


Fig. 4. Photomicrograph of the dura mater stained by the ABC method with monoclonal antibody (ESP6) against t-PA. The endothelial cells of veins (arrowheads) are stained moderately, and those of artery (arrows) are stained weakly. Couterstained with hematoxylin. $\times 50$.

(n=83), 硬膜下水腫例の t-PA 値は $3.1 \pm 1.6 \text{ ng/ml}$ (n=10) で, 血腫の t-PA 値は他の 2 群より有意に高値を示した ($p < 0.01$) (図 6). 末梢血中 t-PA 値は麻酔中に採取したものでは $3.5 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$ (n=50), 安静時に採取したものでは $3.4 \pm 1.3 \text{ ng/ml}$ (n=22) で, 両者に有意差は認めなかった.

Table 1. Intensity of t-PA staining in the capsule of chronic subdural hematoma.

Antibody	ESP4	ESP5	ESP6
Dura mater			
endothelium of artery	-	-or+	-or+
endothelium of vein	-or+	‡	‡
Outer membrane			
endothelium of sinusoid	+	‡	‡
endothelium of capillary	+	‡	‡
endothelium of arteriole	-	-	-
fibroblast	-	-	-
eosinophil	-	-	-
neutrophil	-	-	-
lymphocyte	-	-	-
macrophage	-	-	-
plasma cell	-	-	-
Inner membrane			
	-	-	-

Symbols represent the staining intensity: +, weak reaction; ‡, moderate reaction; ‡, strong reaction; -, no reaction.

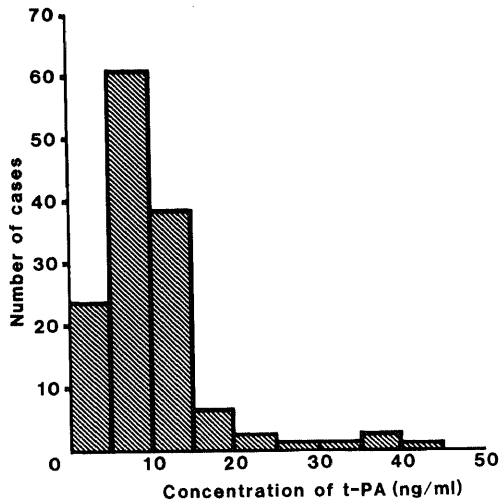


Fig. 5. Distribution of t-PA values in hematoma. Histogram shows a logarithmic normal distribution. The upper limit of t-PA in normal human plasma is 7 ng/ml, while t-PA values of 70% in cases with chronic subdural hematoma are more than 7 ng/ml.

血腫外膜における血管洞の発達について, 各症例の外膜を光学顕微鏡50倍視野の観察により, 血管洞が著明に発達しているものをIII群 (図 7A), 血管洞が少ないものをI群 (図 7C), 両者の中間をII群 (図 7B) の3つの群に分類して血腫中 t-PA 値を比較した. 血腫中 t-PA 値は, I群 (+) で $7.2 \pm 3.1 \text{ ng/ml}$ (n=40), II群 (++) では $9.2 \pm 4.2 \text{ ng/ml}$ (n=30), III群 (+++) では $11.9 \pm 4.1 \text{ ng/ml}$ (n=15) で血管洞の発達しているものほど血腫中 t-PA 値は高い傾向を示した (図 8).

III. 血腫内容の線溶系因子, ヘモグロビンおよび白血球と t-PA 値

末梢血中のプラスミノゲン値, FDP 値は概ね正常範囲内であった. 血腫中プラスミノゲンは末梢血

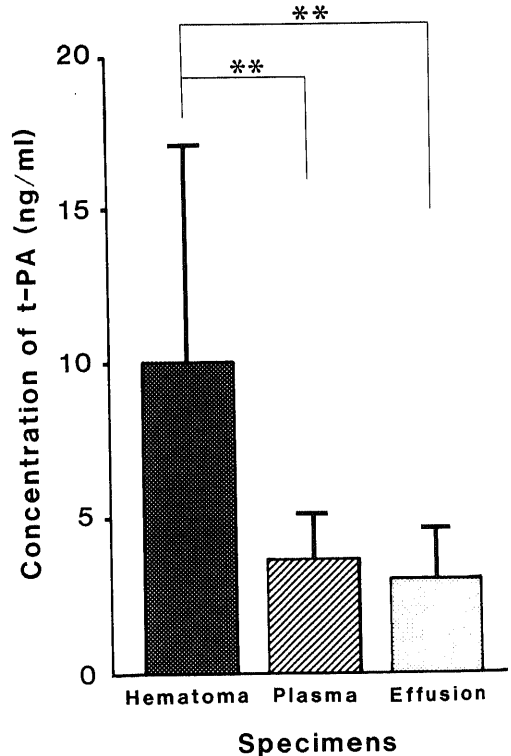


Fig. 6. t-PA in fluids. Each column indicates the mean \pm S. D. Hematoma, chronic subdural hematoma (n=141); Plasma, Plasma of patients with chronic subdural hematoma (n=83); Effusion, subdural effusion (n=10). The concentration of t-PA in chronic subdural hematoma is significantly higher than in plasma or subdural effusion. **, $p < 0.01$ by ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison.

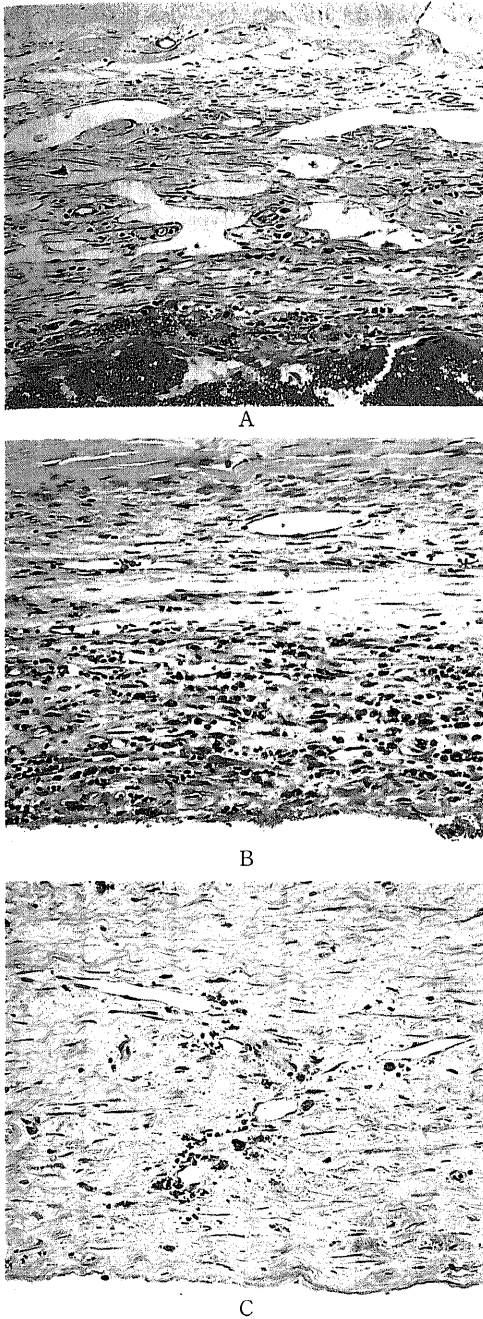


Fig. 7. The outer membranes of chronic subdural hematoma. They were classified into three types according to the degree of development of sinusoids, that is, outer membrane with a large (A), intermediate (B), and small (C) amount of sinusoids as shown in figures, respectively. Lower side of each figure indicates hematoma cavity. Hematoxylin & Eosin stain. $\times 50$.

のそれより低値で、血腫中 FDP は末梢血中のそれよりも著明な高値を示した (表 2)。血腫中のプラスミノーゲン値、FDP 値、ヘモグロビン値、血腫内の好酸球、好中球数およびリンパ球数と血腫中 t-PA 値との間に相関は見い出せなかった。

IV. 血腫腔への出血量と t-PA 値

慢性硬膜下血腫 24 症例について、血腫腔への 1 日あたりの出血量は血腫容積の 0.1% から 14%、平均 2.7% であった。出血量と血腫内 t-PA 値の間には有意な相関は認められなかった。

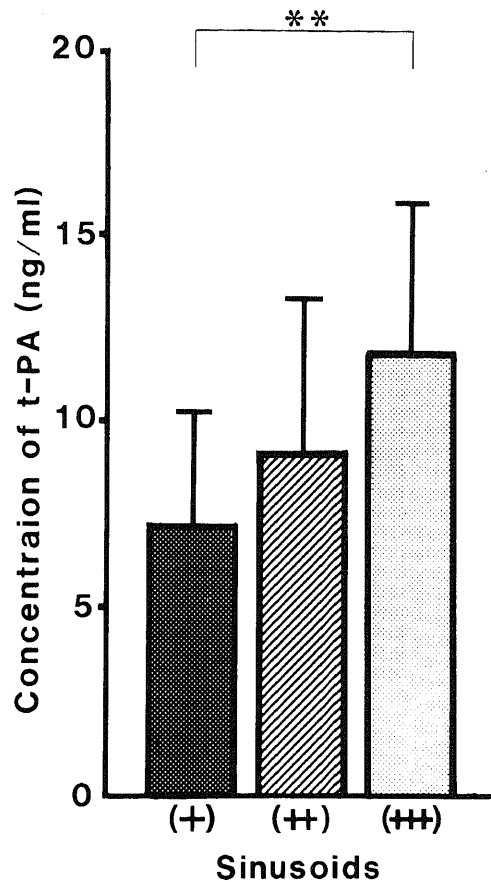


Fig. 8. The amount of sinusoids in the outer membrane and t-PA. (+), outer membrane with a small amount of sinusoids ($n=40$); (++) , moderate amount of sinusoids ($n=30$); (+++), large amount of sinusoids ($n=15$). The more sinusoids in the outer membrane are developed, the higher concentration of t-PA is contained in the hematoma fluid.

** , $p < 0.01$ by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison.

V. 各種 モデータとの比較

1. 外傷から手術までの期間と血腫中 t-PA 値の検討

外傷の既往がはっきりしている67症例について、手術までの日数と血腫中の t-PA 値の関係を検討した。t-PA 値はおよそ30日から50日の間にピークがあった。この時期を過ぎると t-PA 値は次第に減少傾向を示し、外傷から手術までの期間が長くなると血腫内 t-PA 値は正常よりも高値ながら、より低いレベルに留まった (図9)。

2. 血腫内凝血の有無と血腫中 t-PA 値

手術時に血腫内における凝血の有無を肉眼的に確認し血腫中 t-PA 値を比較した。凝血のみられない群 (-) では $11.3 \pm 7.5 \text{ ng/ml}$ ($n=76$)、少量の凝血群 (+) では $10.8 \pm 7.5 \text{ ng/ml}$ ($n=30$)、多量の凝血群

(++) では $6.0 \pm 3.6 \text{ ng/ml}$ ($n=17$) という結果で、血腫内に凝血の多い群ほど t-PA 値は低い傾向を示した (図10)。

3. 頭部 CT 所見と血腫中 t-PA 値

慢性硬膜下血腫の X線吸収係数より、①低吸収型 (low density type)、②等吸収型 (iso-density type)、③高吸収型 (high density type)、④混合型 (mixed density type)、⑤層形成型 (layering type) の5型に分類し各型の t-PA 値を比較した。各型の t-PA 値は、①低吸収型では $7.9 \pm 5.7 \text{ ng/ml}$ ($n=19$)、②等吸収型では $9.2 \pm 5.2 \text{ ng/ml}$ ($n=40$)、③高吸収型では $9.9 \pm 4.3 \text{ ng/ml}$ ($n=34$)、④混合型では $8.2 \pm 3.9 \text{ ng/ml}$ ($n=27$)、⑤層形成型では $14.6 \pm 9.7 \text{ ng/ml}$ ($n=18$) で、層形成型は他の型より血腫中 t-PA は高い値をとる傾向を示した (図11)。

Table 2. Plasminogen and FDP in chronic subdural hematoma

	plasminogen (%)	FDP ($\mu\text{g/ml}$)
Hematoma	47.0 ± 23.4 ($n=97$) †	1068.6 ± 756.0 ($n=119$) †
Peripheral blood	84.3 ± 24.0 ($n=51$)	7.1 ± 5.5 ($n=63$)

FDP, fibrinogen and fibrin degradation products.

Values are mean \pm S.D.

† Significantly different from peripheral blood ($p < 0.01$).

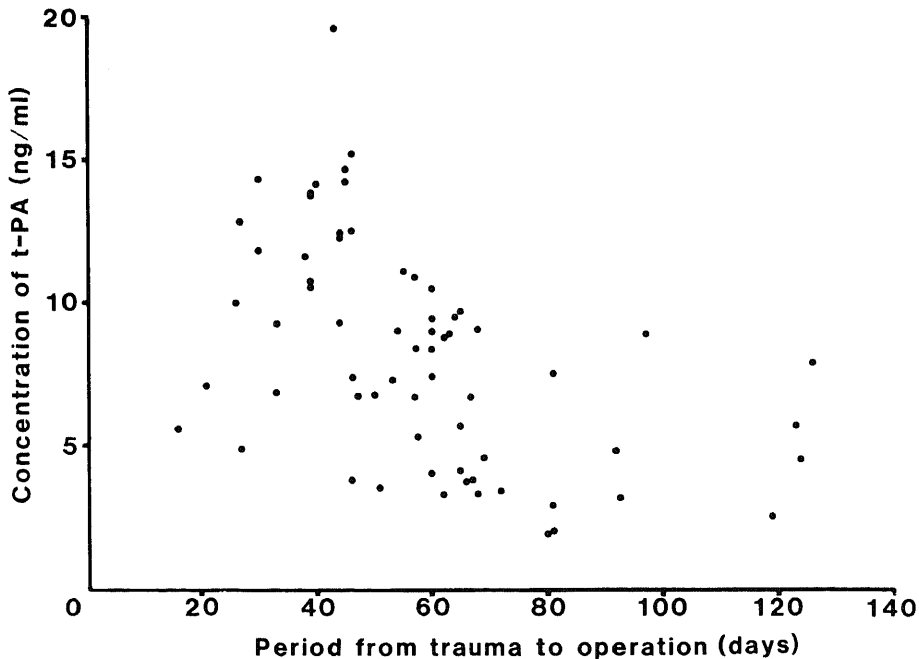


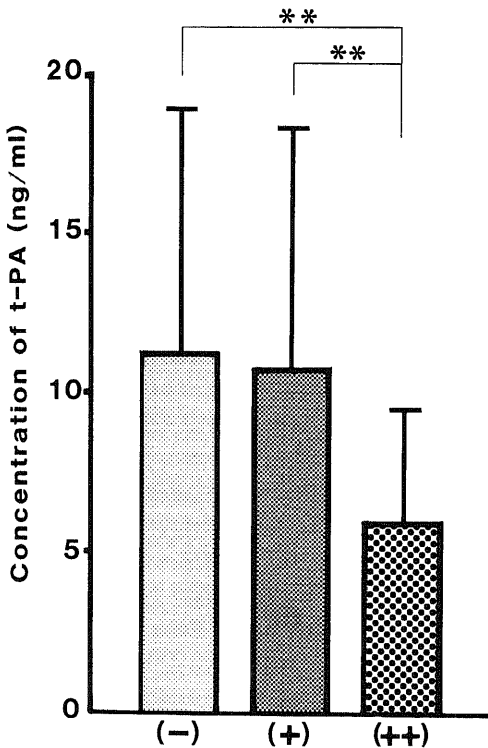
Fig. 9. Intervals from trauma to operation and t-PA. Peak level of t-PA is seen between 30th day and 50th day from trauma. Thereafter, t-PA values decrease.

4. 手術前の症候分類と血腫中 t-PA 値

症候分類は、Markwalder の分類²⁰⁾を改編したものをを用いた。すなわち Grade 0, 無症状; Grade 1, 意識清明, 頭痛, 腱反射の軽度左右差; Grade 2, 傾眠, 失見当識, 半身不全麻痺; Grade 3, 昏迷, 片麻痺; Grade 4, 昏睡, 除脳硬直; Grade 5, 痲呆などの精神症状。以上の5段階に分類し各群の t-PA 値を比較した。各群の t-PA 値は, Grade 0 で 6.8 ± 2.5 ng/ml (n=5), Grade 1 で 10.5 ± 7.0 ng/ml (n=33), Grade 2 で 9.2 ± 5.4 ng/ml (n=57), Grade 3 で 12.6 ± 9.9 ng/ml (n=17), Grade 4 で 19.9 ± 2.6 ng/ml (n=3), Grade 5 で 8.1 ± 4.9 ng/ml (n=12) であった。Grade 4 の群では他の群よりも血腫中 t-PA は高い値をとる傾向を示した (図12)。

考 察

線維素溶解現象 (線溶, fibrinolysis) とは血液中に存在する前駆物質であるプラスミノノーゲンが活性化さ



Clot in hematoma

Fig.10. The amount of clot in hematoma and t-PA. (-), absent; (+), small amount; (++) large amount. **, $p < 0.01$ by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison.

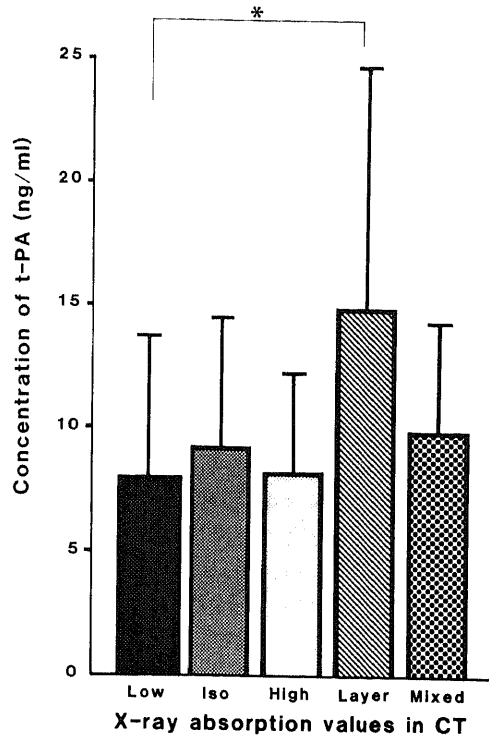


Fig.11. X-ray absorption values in CT images and t-PA. The t-PA level of layering type is higher than that of any other types. *, $p < 0.05$ by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison.

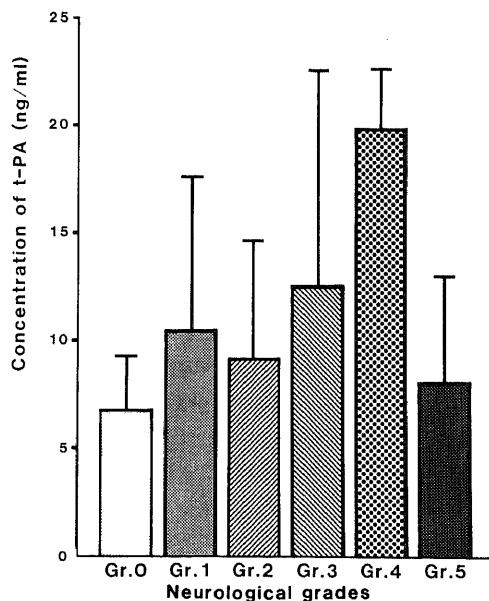


Fig.12. Modified Markwalder's neurological grades and t-PA. The t-PA level of grade 4 is higher than that of any other grades.

れてプラスミンに変換された結果、プラスミンによってフィブリンおよびフィブリノーゲンが分解される現象である。この結果、フィブリンおよびフィブリノーゲンの分解産物 (FDP) が生成される。線溶系の活性化機構は、プラスミノゲンアクチベーター (plasminogen activator, PA) による外因性活性化と、第Ⅹ因子活性化を介する内因性活性化とに分けられるが、短期的かつ強力な線溶系活性化の発現は外因性活性化に負うところが大きいとされる。

PA は今日、その生化学的特性および免疫学的特性により組織 PA (t-PA) とウロキナーゼ (urokinase-type plasminogen activator, u-PA) とに大別されている。1946年 Fischer²⁶⁾ は種々の組織が、血漿中の線溶の酵素原 (fibrinolytic pro-enzyme) のアクチベーターを生成することを提唱し、1947年 Astrup ら²⁷⁾ は動物の器官において初めて組織由来のプラスミノゲンアクチベーター (tissue activator) の存在を示した。その後、ヒト血管の灌流液中での u-PA とは異なる PA (vascular PA, v-PA) の存在²⁸⁾ や、血管内皮細胞による t-PA の合成が示され²⁹⁾、ヒト子宮から t-PA の精製も行われた³⁰⁾。その後の研究により、v-PA と t-PA は同一の物質であることが免疫学的に確かめられ、共に血管内皮細胞由来であることが示された^{31,32)}。ヒト組織あるいは動物組織で大量の t-PA の精製品を入手することが困難であったことが t-PA 研究における最大の制約となっていたが、培養ヒトメラノーマ細胞 (Bowes 株) が高濃度に t-PA を産生分泌することが見出され³³⁾、t-PA に関する研究はここ数年飛躍的に発展した。Pennica ら³⁴⁾ はメラノーマ細胞から t-PA に対する mRNA を得て、遺伝子工学的手法により t-PA のアミノ酸配列を明らかにした。この遺伝子組換えによりさらに大量の t-PA (recombinant t-PA) が得られるようになっている。また t-PA に対する抗体が各種精製され^{35)~38)}、これを利用して t-PA の測定法や t-PA の組織内局在に関する研究の進展がみられた。

慢性硬膜下血腫における血腫内容中の線溶活性の亢進は、これまでフィブリン平板法 (fibrin plate method)³⁹⁾ で証明されたものが多い^{40)~42)}。また望月⁴³⁾ はフィブリン平板法から血腫外膜の t-PA 活性は高いが血腫中の t-PA 活性は低いと結論した。しかしこの方法は t-PA の他にプラスミノゲン、フィブリノーゲン、線溶系のインヒビターなど検体中の多くの因子に影響され、t-PA の絶対値を測定することができないという欠点がある。t-PA の測定法としては¹²⁵I フィブリンプレート法、immunoradiometric assay (IR-

MA)、radioimmunoassay (RIA) などがあるが、近年、抗 t-PA 抗体を利用した ELISA が開発され、radioimmunoassay にとって代わるようになった。本法では抗 t-PA 抗体の使用により活性型および非活性型の t-PA をより特異的に測定することが可能である。

本研究では ELISA 法により t-PA 値を測定した。ELISA 法による正常成人末梢血における t-PA の正常値は、Bergsdorf ら²²⁾ は $4.0 \pm 1.8 \text{ ng/ml}$ と報告し、Matsuo ら⁴⁴⁾ は $1.2 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ と報告している。本研究において慢性硬膜下血腫の患者末梢血83例における t-PA 値は $3.7 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$ 、硬膜下水腫10例では $3.1 \pm 1.6 \text{ ng/ml}$ と低値であったのに対し、慢性硬膜下血腫141側の血腫内容中の t-PA 値は $10.1 \pm 6.9 \text{ ng/ml}$ と前2者に比べて有意に高値を示した。また98例 (約70%) が正常上限と考えられる 7 ng/ml を越えていた。この結果から慢性硬膜下血腫における線溶活性亢進の原因は、血腫被膜における t-PA の過剰産生に求めることができる。

各種組織において血管壁とくに血管内皮細胞での PA の局在が主張され^{29,45,46)}、慢性硬膜下血腫においても、Ito ら¹⁹⁾ は Todd 法により t-PA 活性が外膜の血管洞に一致して見られることを示した。一方、最近では血管内皮細胞以外の各種の細胞における t-PA の生成が知られ、慢性硬膜下血腫の被膜にみられる線維芽細胞⁴⁷⁾、マクロファージ⁴⁸⁾、好中球⁴⁹⁾ など t-PA を生成、分泌することが報告されている。Todd 法でみられるフィブリン溶解活性は t-PA 分泌の間接的な証拠であり、また t-PA の抗原量の増加は必ずしも t-PA 活性と相関しない^{23,50)} ことから t-PA の正確な生成部位を知るには限界がある。そのため本研究においては t-PA に対するモノクローナル抗体を用い、免疫組織学的に t-PA の同定を試みた。

免疫組織学的手法は Todd 法と比較して、1) 解像力が高いこと、2) インヒビターの影響が少ないこと、3) 活性を有するプラスミノゲンアクチベーターの他、非活性のものも検出できることなどの利点を有する。本研究における免疫組織学的検索によって得られた結果では、血腫外膜の血管洞や毛細血管の内皮細胞内に強陽性の t-PA の免疫反応が見られた。血管内皮細胞以外の細胞には t-PA の反応は認められず、また血腫内膜にも t-PA の免疫反応は認められなかった。硬膜の動脈や静脈では t-PA の反応が認められたが、硬膜の血管は外膜に比べてその数が極端に少なく血腫腔との間に外膜が介在していることから血腫腔内への t-PA 放出という点では重要性に乏しい。む

しる硬膜の動静脈での t-PA の免疫反応は、血管内での抗血栓作用発現のために生理的に存在する t-PA を示すと考えられる。したがって慢性硬膜下血腫被膜における主な t-PA の生成場所は外膜の血管洞と毛細血管の内皮細胞であり、血腫内容中において高値を示す t-PA はこれらの細胞からの t-PA の過剰分泌に由来するものと結論づけられる。

Kwaan⁵¹⁾は組織修復に携わる結合組織では、幼若な毛細血管の内皮細胞は多量の PA を有し、組織修復が進むにつれて血管は消滅して線溶性は次第に消失するとした。慢性硬膜下血腫外膜の多量の t-PA が一方で組織修復の役割を担うとしても、t-PA の過剰な生成と放出に始まる線溶活性の亢進により血腫増大が生じる機構に、以下の要因が関与すると考えられる。t-PA はフィブリン親和性が高く、t-PA のプラスミノゲンを活性化する機構は、表 3 に示すようにフィブリンとの複合体を形成することに始まる。フィブリンが存在すると t-PA の活性化速度は、存在しない場合に比べ 100 倍にも増加し^{52,53)}、またフィブリンの凝血そのものが t-PA の放出を促進する⁵⁴⁾。さらに慢性硬膜下血腫における線溶亢進は、二次線溶が主であることが確かめられている^{19,55)}。外膜の毛細血管の開口部に形成される血栓は内皮細胞からの t-PA の放出を刺激し、過剰な線溶活性の亢進をもたらされることとなる。一方、慢性硬膜下血腫の血腫内容液中には多量の FDP が含まれる。FDP は t-PA 活性化促進作用⁵⁶⁾、抗トロンピン作用⁵⁷⁾、血小板凝集阻害作用⁵⁸⁾を有し、さらにフィブリンの架橋を阻害するために過剰の FDP の存在によって構造的に脆いフィブリンポリマーが形成される^{59,60)}。また t-PA によりプラスミノゲンから変換されたプラスミンは第 V、第 VIII、第 XI 凝固因子を分解する⁶¹⁾。このようにして、単に t-PA の活性化がフィブリンだけでなく FDP によっても促進され、さらに血腫内では凝固系の要素も障害されており、より出血が起こり易い環境が形成されている。すなわち、正常の止血機構として毛細血管の開口部に形成されたフィブリンの凝血は、血腫内の多量の FDP のために脆く分解され易く、他方、血管内皮細胞から t-PA の放出を促し、また FDP と共に t-PA の活性化を著明に増強する。多量のプラスミン生成により形成された止

血、凝固の起こりにくい環境のもとで、毛細血管開口部に形成された構造的に脆い血栓は過剰の t-PA 放出による線溶活性の亢進により容易に分解され、外膜血管からの出血が繰り返されることとなる。血腫内において成立する以上のような一種の悪循環により、慢性硬膜下血腫の血腫増大がおけると考えられる。慢性硬膜下血腫症例のほとんどは血腫の洗浄術のみで治癒するが、それは洗浄により上記のような悪循環が断たれることによる。外傷から 30~50 日で t-PA 値はピークを示したが、この間で症例毎に t-PA 値のばらつきが大きい。これは、t-PA の半減期が 2~6 分^{62,63)}と短いことが関係する一方、毛細血管開口部の血栓形成に左右されて t-PA が断続的に放出されることを示唆する。外傷からの臨床経過が長い症例において血腫内 t-PA 値が比較的低下するのは、外膜の器質化に伴い t-PA の産生場所である血管が減少していくためである。また血腫内凝血の多寡と血腫内 t-PA 値との関係は、t-PA の分泌量や活性の程度あるいは t-PA の凝血内への取り込み等を反映していると考えられる。

t-PA の分子構造や諸特性に関する研究が進み、t-PA 分子における活性部位やフィブリンとの結合領域を認識する抗体が開発されてきた^{21,64)}。本研究において使用した抗 t-PA 抗体のうち、抗体 ESP4 は t-PA の活性基に近接した部位に結合し、抗体 ESP5 および ESP6 は活性基と離れた部位に結合するという特性を有する²¹⁾。一次抗体として抗体 ESP4 を用いた場合に t-PA の免疫反応が微弱であったことは、外膜の血管内皮細胞内の t-PA の多くは非活性な状態で存在していることを示唆する。また血腫内の t-PA 量と、血腫内 FDP やプラスミノゲンとの間には有意な相関がなかったことから、t-PA の量と t-PA 活性とは区別すべきものであり、インヒビターその他の因子による影響が示唆される。

t-PA には 1 本鎖のものと 2 本鎖のものがおり、1 本鎖 t-PA はプラスミンで容易に限定分解されジスルフィドで結合した 2 本鎖 t-PA に変わることが知られている⁶⁵⁾。1 本鎖 t-PA から 2 本鎖 t-PA への変換はフィブリン表面上で起こり⁶⁶⁾、しかも t-PA は血管内皮細胞内では非活性な 1 本鎖の形で生成され、細胞から放出後に活性の高い 2 本鎖 t-PA に変換されるという⁶⁶⁾。ひとつの可能性として、慢性硬膜下血腫外膜の血管内皮細胞内の t-PA は 1 本鎖 t-PA であるという推定ができる。また、血管内皮細胞は t-PA と共に、その特異的なインヒビター (plasminogen activator inhibitor; PAI) をも生成することが知られ⁶⁶⁾、線溶活性は PAI と t-PA とのバランスによって決定される。

Table 3. Activation mechanism of plasminogen by t-PA.

1. t-PA + fibrin → t-PA · fibrin complex
2. t-PA · fibrin complex + plasminogen → plasmin

Schleef ら⁶⁷⁾は抗 t-PA モノクローナル抗体によってヒト臍帯静脈内皮細胞の細胞内における t-PA の形態を調べた結果、t-PA と PAI の両者が遊離して存在する場合と、t-PA と PAI とが複合体を形成して存在する場合があるとした。抗体 ESP4 による染色結果が、PAI との複合体形成によるものとする考えも今回の検索からは確証が得られない。しかし抗体 ESP5、ESP6 を用いた場合に、症例によって t-PA の染色性に差がみられなかったことから、慢性硬膜下血腫の血腫増大速度や、あるいは治癒過程における PAI の影響が示唆される。すなわち大部分の慢性硬膜下血腫症例で血腫増大がゆっくりと進行するのは、血管内皮細胞内の t-PA の抗原量が過剰であっても、その活性が PAI により抑制を受けるためであり、PAI による抑制が勝れば、血腫は治癒の方向へ向かうと考えられる。一方、慢性硬膜下血腫症例のなかには急速な脳卒中様の発症様式をとるものが稀にあるが、これは PAI の抑制をはるかに上回る t-PA 量の放出によって過剰な線溶活性亢進が生じるためと考えられる。今回の検索で血腫中のヘモグロビン値および血腫内への出血量と t-PA 値との間に有意の相関がみられなかったのは t-PA と PAI との複合体形成の影響と考えられ、被膜からの出血は過剰の t-PA 産生が原因であるとする考えを否定するものではない。

t-PA およびインヒビターの分泌は各種のホルモンによって促進される⁶⁸⁾。被膜の生成過程や血腫増大における t-PA の役割を考える上で内分泌系の影響も考慮する必要があると思われるが、この点に関しては今後の研究が待たれる。

結 論

tissue-type plasminogen activator (t-PA) に対するモノクローナル抗体を用いて慢性硬膜下血腫の被膜における t-PA の免疫組織学的同定を行ない、また enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) により、慢性硬膜下血腫の血腫内容における t-PA 値を測定し、慢性硬膜下血腫の血腫増大の機序に対する t-PA の役割を検討した。

1. 被膜の免疫組織学的検索では、血腫外膜の血管洞および毛細血管の内皮細胞に t-PA の免疫反応が強く認められた。細動脈には反応は、ほとんど見られず、血管内皮細胞以外の各種炎症細胞や線維芽細胞などには t-PA の免疫反応は認められなかった。血管洞と毛細血管の内皮細胞に存在する t-PA は、多くは非活性の状態で存在することが推測された。硬膜の動静脈の壁にも t-PA の免疫反応がみられたが、これは生

理的に存在する t-PA を示すと考えられた。血腫内膜にも t-PA の反応は認められなかった。

2. 血腫内容141例の t-PA 値は 1.2ng/ml から 41.2ng/ml で対数正規分布型を示した。その平均値±標準偏差は $10.1\pm 6.9\text{ng/ml}$ で、慢性硬膜下血腫患者末梢血83例の t-PA 値 $3.7\pm 1.4\text{ng/ml}$ 、および硬膜下水腫10例の t-PA 値 $3.1\pm 1.6\text{ng/ml}$ に比べて有意に高値を示した。外膜の血管洞がよく発達している症例では血腫内 t-PA 値は高値であった。慢性硬膜下血腫における局所的線溶活性の亢進は、血腫外膜の血管洞や毛細血管の内皮細胞における t-PA の過剰産生、過剰放出が本態と考えられた。血腫中の t-PA 値は、外傷から30日から50日の間にピークがみられたが、この間で症例毎に t-PA 値のばらつきが大きいことは毛細血管開口部の血栓形成に左右されて t-PA が断続的に放出されることを示唆すると考えられ、この期間を過ぎると t-PA 値が減少していくのは、血腫外膜の器質化に伴い外膜の血管が減少してゆくためと考えられた。

3. 血腫中の FDP は高値で、プラスミノーゲンは低値であったが、血腫中の t-PA 値との間に有意の相関はみられなかった。血腫中ヘモグロビン値および血腫腔への出血量と t-PA 値との間にも相関はみられなかった。これらは PAI による t-PA 活性の抑制の影響で、t-PA の過剰産生と放出そのものが線溶能の発現および出血にはそのまま反映されないことを示唆すると考えられた。

4. 血腫内凝血の多寡と血腫内 t-PA 値との関係は、t-PA の分泌量や活性の程度、あるいは t-PA の凝血内への取り込み等を反映していると考えられた。

5. 正常の止血機構として外膜内毛細血管の血腫腔への開口部に形成されたフィブリンの凝血は、血腫内の多量の FDP のために脆く分解され易く、血管内皮細胞から t-PA の放出を促し FDP と共に t-PA の活性化を増強する。一方、t-PA による多量のプラスミン生成により、血腫内には止血、凝固の起こりにくい環境が形成される。毛細血管開口部に形成された構造的に脆い血栓は過剰の t-PA 放出による線溶活性の亢進により容易に分解され、この結果、外膜血管からの出血が繰り返され慢性硬膜下血腫の増大が起こると推定される。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部脳神経外科、山下純宏教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行に際し、御指導頂きました金沢大学脳神経外科、山本信二郎名誉教授、直接の御指導、御助言を頂

きました伊藤治英助教授ならびに教室の諸先生方に深謝致します。また、統計学的処理について貴重な御指導を賜りました金沢大学医学部衛生学、橋本和夫教授に深く感謝の意を表します。さらに資料の収集に御協力頂きました関連病院脳神経外科の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) **Virchow, R.:** Das Hamatoma der Dura mater. *Verhandl. d. phys. med. Gesellsch. z. Wurtzburg*, **7**, 134-142 (1857).
- 2) **Trotter, W.:** Chronic subdural hemorrhage of traumatic origin, and its relation to pachymeningitis haemorrhagica interna. *Br. J. Surg.*, **2**, 271-291 (1914).
- 3) **中村紀夫:** 慢性硬膜下血腫の発生機序. *脳神経*, **18**, 702-710 (1966).
- 4) **伊藤梅男, 藤本 司, 稲葉 穰:** 慢性硬膜下血腫の成立機序に関する研究 (第1報) - 慢性硬膜下血腫 (Cystic Hematoma) の臨床病理学的研究. *脳外*, **2**, 47-61 (1974).
- 5) **山本信二郎:** 慢性硬膜下血腫. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, **19**, 401-409 (1979).
- 6) **Gardner, W. J.:** Traumatic subdural hematoma. With particular reference to the latent interval. *Arch. Neurol. Psychiat.*, **27**, 847-858 (1932).
- 7) **下地 隆:** 慢性硬膜下血腫の膠質浸透圧. *十全医会誌*, **94**, 724-733 (1985).
- 8) **Ito, H., Shimoji, T., Yamamoto, S., Saito, K. & Uehara, S.:** Colloidal osmotic pressure in chronic subdural hematoma. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, **28**, 650-653 (1988).
- 9) **Peyton, W. T., Moore, G. E., French, L. A. & Chou, S. N.:** Localization of intracranial lesions by radioactive isotopes. *J. Neurosurg.*, **9**, 432-442 (1952).
- 10) **水腰英隆:** 慢性硬膜下血腫に関する研究. *十全医会誌*, **83**, 804-819 (1974).
- 11) **Putnam, T. J. & Cushing, H.:** Chronic subdural hematoma. *Arch. Surg.*, **11**, 329-393 (1925).
- 12) **山本信二郎, 伊藤治英, 水腰英隆, 吉田早苗:** 慢性硬膜下血腫における血腫被膜からの出血の意義. *脳外*, **2**, 239-242 (1974).
- 13) **Ito, H., Yamamoto, S., Komai, T. & Mizukoshi, H.:** Role of local hyperfibrinolysis in the etiology of chronic subdural hematoma. *J. Neurosurg.*, **45**, 26-31 (1976).
- 14) **山嶋哲盛:** 慢性硬膜下血腫の成因 - 血腫増大機序と発症要因について -. *十全医会誌*, **88**, 84-121 (1979).
- 15) **Ito, H., Komai, T. & Yamamoto, S.:** Fibrin and fibrinogen degradation products in chronic subdural hematoma. *Neurol. Med. Chir.*, **15**, 51-55 (1975).
- 16) **Ito, H., Komai, T. & Yamamoto, S.:** Fibrinolytic enzyme in the lining walls of chronic subdural hematoma. *J. Neurosurg.*, **48**, 197-200 (1978).
- 17) **Labadie, E. L. & Glover, D.:** Local alteration of hemostatic fibrinolytic mechanisms in reforming subdural hematomas. *Neurol.*, **25**, 669-675 (1975).
- 18) **前田 優:** 慢性硬膜下血腫の血腫内容の線溶活性 - ユーグロブリン分画線溶時間測定 -. *十全医会誌*, **93**, 228-241 (1984).
- 19) **木村 誠:** 慢性硬膜下血腫内容液の凝固線溶活性 - Thrombelastgraph による検索 -. *十全医会誌*, **96**, 1113-1128 (1987).
- 20) **Saito, K., Ito, H., Hasegawa, T. & Yamamoto, S.:** Plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex and α_2 -plasmin inhibitor in chronic subdural hematoma. *J. Neurosurg.*, **70**, 68-72 (1989).
- 21) **MacGregor, I. R., Micklem, L. R., James, K. & Pepper, D. S.:** Characterization of epitopes on human tissue plasminogen activator recognized by a group of monoclonal antibodies. *Thromb. Haemostas.*, **53**, 45-50 (1985).
- 22) **Bergsdorf, N., Nilsson, T. & Wallén, P.:** An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease. *Thromb. Haemostas.*, **50**, 740-744 (1983).
- 23) **Ito, H., Saito, K., Yamamoto, S. & Hasegawa, T.:** Tissue-type plasminogen activator in the chronic subdural hematoma. *Surg. Neurol.*, **30**, 175-179 (1988).
- 24) **Ito, H., Yamamoto, S., Saito, K., Ikeda, K. & Hisada, K.:** Quantitative estimation of hemorrhage in chronic subdural hematoma using ^{51}Cr erythrocyte labeling method. *J. Neurosurg.*, **66**, 862-864 (1987).
- 25) **Markwalder, T. M., Steinsiepe, K. F.,**

- Rohner, M., Reichenbach, W. & Markwalder, H.: The course of chronic subdural hematomas after burr-hole craniostomy and closed-system drainage. *J. Neurosurg.*, **55**, 390-396 (1981).
- 26) Fischer, A.: Mechanism of the proteolytic activity of malignant tissue cells. *Nature*, **157**, 442 (1946).
- 27) Astrup, T. & Permin, P. M.: Fibrinolysis in the animal organism. *Nature*, **159**, 681-682 (1947).
- 28) Aoki, N. & Von Kaulla, K.: Dissimilarity of human vascular plasminogen activator and human urokinase. *J. Lab. Clin. Med.*, **78**, 354-362 (1971).
- 29) Loskutoff, D. J. & Edgington, T. S.: Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3903-3907 (1977).
- 30) Rijken, D. C., Wijngaards, G., Zaal-de Jong, M. & Welbergen, J.: Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, **580**, 140-153 (1979).
- 31) Rijken, D. C., Wijngaards, G. & Welbergen, J.: Relationship between tissue plasminogen activator and the activators in blood and vascular wall. *Thromb. Res.*, **18**, 815-830 (1980).
- 32) Angles-Cano, E., Balaton, A., Le Bonniec, B., Genot, E., Elion, J. & Sultan, Y.: Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood*, **66**, 913-920 (1985).
- 33) Rijken, D. C. & Collen, D.: Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J. Biol. Chem.*, **256**, 7035-7041 (1981).
- 34) Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., Bennet, W. F., Yelverton, E., Seeburg, P. H., Heyneker, H. L. & Goeddel, D. V.: Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. Coli*. *Nature*, **301**, 214-221 (1983).
- 35) Nielsen, L. S., Hansen, J. G., Andreasen, P. A., Skriver, L., Dan, K. & Zeuthen, J.: Monoclonal antibody to human 66,000 molecular weight plasminogen activator from melanoma cells. Specific enzyme inhibition and one-step affinity purification. *EMBO, J.*, **2**, 115-119 (1983).
- 36) Angles-Cano, E. & Sultan, Y.: A solid-phase fibrin immunoassay for the specific detection of monoclonal antibodies against different epitopic determinants of tissue-plasminogen activators. *J. Immunol. Methods*, **69**, 115-127 (1984).
- 37) Schleef, R. R., Sinha, M. & Loskutoff, D. J.: Characterization of two monoclonal antibodies against human tissue-type plasminogen activator. *Thromb. Haemostas.*, **53**, 170-175 (1985).
- 38) Holvoet, P., Cleemput, H. & Collen, D.: Assay of human tissue-type plasminogen activator (t-PA) with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies to t-PA. *Thromb. Haemostas.*, **54**, 684-687 (1985).
- 39) Astrup, T. & Stage, A.: Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature*, **170**, 929 (1952).
- 40) 小林 端: 慢性硬膜下血腫の成因に関する研究. 特に線維素溶解現象との関係について. *名市大医誌*, **19**, 214-233 (1968).
- 41) 駒井杜詩夫, 伊藤治英, 山嶋哲盛, 山本信二郎: 慢性硬膜下血腫の成因—局所線溶活性の観点から—. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, **17**, 499-505 (1977).
- 42) 駒井杜詩夫: 慢性硬膜下血腫における線溶活性. *十全医会誌*, **87**, 194-205 (1978).
- 43) 望月龍二: 慢性硬膜下血腫における tissue plasminogen activator 活性の意義. *脳神経*, **39**, 947-952 (1987).
- 44) Matsuo, O., Kato, K., Matsuo, C. & Matsuo, T.: Determination of tissue plasminogen activator by an enzyme-immunoassay method. *Anal. Biochem.*, **135**, 58-63 (1983).
- 45) Todd, A. S.: The histological localisation of fibrinolysin activator. *J. Pathol.*, **78**, 281-283 (1959).
- 46) Todd, A. S.: Localization of fibrinolytic activity in tissues. *Brit. med. Bull.* **20**, 210-212 (1964).
- 47) Dodd, I., Browne, M. J. & Robinson, J. H.: Identification of the calcium-inducible plasminogen activators secreted by a human diploid fibroblast cell line (MRC-5). *Thromb. Res.*, **40**,

- 693-702 (1985).
- 48) **Unkless, J. C., Gordon, S. & Reich, E.:** Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.*, **139**, 834-850 (1974).
- 49) **Wunschmann-Henderson, B., Horwitz, D. L. & Astrup, T.:** Release of plasminogen activator from viable leukocytes of man, baboon, dog and rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **141**, 634-638 (1972).
- 50) **Holvoet, P., Boes, J. & Collen, D.:** Measurement of free, one-chain tissue-type plasminogen activator in human plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay based on an active site-specific murine monoclonal antibody. *Blood*, **69**, 284-289 (1987).
- 51) **Kwaan, H. C. & Astrup, T.:** Tissue repair in presence of locally applied inhibitors of fibrinolysis. *Exp. Mol. Pathol.*, **11**, 82-88 (1969).
- 52) **Camiolo, S. M., Thorsen, S. & Astrup, T.:** Fibrinogenolysis and fibrinolysis with tissue plasminogen activator, urokinase, streptokinase-activated human globulin, and plasmin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **138**, 277-280 (1971).
- 53) **Hoylaerts, M., Rijken, D. C., Lijnen, H. R. & Collen, D.:** Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2912-2919 (1982).
- 54) **Messer, D. L., Celandier, D. R. & Guest, M. M.:** Stability of fibrin contiguous to intima of veins. *Circ. Res.*, **11**, 832-837 (1962).
- 55) 斎藤研一, 伊藤治英, 藤沢博亮, 池田清延, 山本信二郎: 慢性硬膜下血腫内容液上清の FDP 分画の測定. *神経外傷*, **10**, 186-189 (1987).
- 56) **Nieuwenhuizen, W., Verheijen, J. H., Vermond, A. & Chang, G. T. G.:** plasminogen activation by tissue activator is accelerated in the presence of fibrin(ogen) cyanogen bromide fragment FCB-2. *Biochim. Biophys. Acta*, **755**, 531-533 (1983).
- 57) **Fletcher, A. P., Alkjaersig, N. & Sherry, S.:** Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states. I. The significance of fibrinogen proteolysis and circulating fibrinogen breakdown products. *J. Clin. Invest.*, **41**, 896-916 (1962).
- 58) **Kowalski, E., Kopec, M. & Wegryniewicz, Z.:** Influence of fibrinogen degradation products (FDP) on platelet aggregation, adhesiveness and viscous metamorphosis. *Thromb. Haemostas.*, **10**, 406-423 (1964).
- 59) **Alkjaersig, N., Fletcher, A. P. & Sherry, S.:** Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states. II. The significance, mechanism and consequence of defective fibrin polymerization. *J. Clin. Invest.*, **41**, 917-934 (1962).
- 60) **Bang, N. U., Fletcher, A. P. & Alkjaersig, N.:** Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states. III. Demonstration of abnormal clot structure by electron microscopy. *J. Clin. Invest.*, **41**, 935-948 (1962).
- 61) **Kwaan, H. C.:** Disorders of fibrinolysis. *Med. Clin. North. Am.*, **56**, 163-176 (1972).
- 62) **Korniger, C., Stassen, J. M. & Collen, D.:** Turnover of human extrinsic (Tissue-type) plasminogen activator in rabbits. *Thromb. Haemostas.*, **46**, 658-661 (1981).
- 63) **Eisenberg, P. R., Sherman, L. A., Tiefenbrunn, A. J., Ludbrook, P. A., Sobel, B. E. & Jaffe, A. S.:** Sustained fibrinolysis after administration of t-PA despite its short half-life in the circulation. *Thromb. Haemostas.*, **57**, 35-40 (1987).
- 64) **Andreasen, P. A., Nielsen, L. S., Grondahl-Hansen, J., Skriver, L., Zeuthen, J., Stephens, R. W. & Dano, K.:** Inactive proenzyme to tissue-type plasminogen activator from human melanoma cells, identified after affinity purification with a monoclonal antibody. *EMBO J.*, **3**, 51-56 (1984).
- 65) **Rijken, D. C., Hoylaerts, M. & Collen, D.:** Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2920-2925 (1982).
- 66) **Philips, M., Juul, A. G. & Thorsen, S.:** Human endothelial cells produce a plasminogen activator inhibitor and tissue-type plasminogen activator-inhibitor complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **802**, 99-110 (1984).
- 67) **Schleef, R. R., Wagner, N. V., Sinha, M. & Loskutoff, D. J.:** A monoclonal antibody that

does not recognize tissue-type plasminogen activator bound to its naturally occurring inhibitor. *Thromb. Haemostas.*, **56**, 328-332 (1986).

68) **Collen, D.**: On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb. Haemostas.*, **43**, 77-89 (1979).

Tissue-type Plasminogen Activator in Chronic Subdural Hematoma Hirotsuke Fujisawa, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **98**, 185—200 (1989)

Key words chronic subdural hematoma, tissue-type plasminogen activator, hyperfibrinolysis, immunohistochemistry, enzyme linked immunosorbent assay

Abstract

In this study, the role of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in the growing mechanism of chronic subdural hematoma was investigated. The capsules of chronic subdural hematoma were immunohistochemically stained with monoclonal antibodies against t-PA. In addition, concentration of t-PA in the hematoma contents and plasmas was measured by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). One hundred and nineteen cases with chronic subdural hematoma involving 141 sides were studied. Twenty patients had bilateral hematoma. Five of 119 patients with chronic subdural hematoma needed reoperation. Ten cases with subdural effusion were also studied. Endothelial cells of sinusoids and capillaries in the outer membrane showed strong immunostaining, while those of arterioles showed no staining. Endothelial cells of veins and arteries in the dura mater showed moderate and weak staining, respectively. No other cells than the endothelial cells were stained. In the inner membrane, t-PA immunoreactivity was not seen. t-PA values in the hematoma contents show a logarithmic normal distribution. The concentration of t-PA in the hematoma content was $10.1 \pm 6.9 \text{ ng/ml}$ (mean \pm S.D.) (N=141), being significantly higher than the plasma ($3.7 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$, n=83) and subdural effusion ($3.1 \pm 1.6 \text{ ng/ml}$, n=10). The more sinusoids in the outer membrane were developed, the higher concentration of t-PA was contained in the hematoma fluid. Fibrin and fibrinogen degradation products (FDP) in the hematoma content were greatly higher than in plasma, and plasminogen in the former was lower than the latter. However, there was no correlation between t-PA value in the hematoma content and FDP or plasminogen. There was no correlation between t-PA level in the hematoma content and hemoglobin, white blood cell and daily hemorrhage into the hematoma cavity. The peak level of t-PA was seen between the 30th day and 50th day after trauma. The t-PA level of layering-type hematoma on computed tomographic images was higher than that of any other types. Also, the t-PA level in patients showing coma (grade 4) was higher than that in patients with any other grades. In chronic subdural hematoma, it is suggested that overproduction and oversecretion of t-PA from the sinusoidal and capillary endothelial cells in the outer membrane causes hyperfibrinolysis, which in turn impairs hemostasis, and repeated hemorrhage from the capillaries would result in enlargement of chronic subdural hematoma.